

6

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 805 348

21 N° d'enregistrement national : 00 02236

51 Int Cl⁷ : G 01 N 33/543, G 01 N 33/533, 33/68, B 01 L 3/00,
C 12 Q 1/68

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 23.02.00.

30 Priorité :

71 Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE Etablissement de caractère scientifique technique et industriel — FR.

43 Date de mise à la disposition du public de la demande : 24.08.01 Bulletin 01/34.

56 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

72 Inventeur(s) : CUZIN MARC, PELTIE PHILIPPE, FONTECAVE MARC, DECOUT JEAN LUC et DUEY-MES CECILE.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : BREVATOME.

54 ANALYSE DE CIBLES BIOLOGIQUES UTILISANT UNE BIOPUCE COMPORTANT UN MARQUEUR FLUORESCENT.

57 L'invention concerne un support d'analyse comportant une pluralité d'oligonucléotides fixés sur ce support, caractérisé en ce que chacun desdits oligonucléotides est marqué par un composé fluorescent qui présente une variation de fluorescence lors de l'hybridation de chaque oligonucléotide marqué avec un oligonucléotide complémentaire.

Un tel support permet d'effectuer une analyse de cibles biologiques en mesurant la variation de fluorescence pour déterminer l'hybridation des cibles avec les oligonucléotides du support.

FR 2 805 348 - A1



**ANALYSE DE CIBLES BIOLOGIQUES UTILISANT UNE BIOPUCE
COMPORTANT UN MARQUEUR FLUORESCENT.**

DESCRIPTION

5 Domaine technique

La présente invention a pour objet un support d'analyse ou « biopuce » destiné à la détermination de cibles biologiques du type ADN ou ARN.

10 Ce support d'analyse trouve des applications dans de nombreux domaines, en particulier en biologie pour le séquençage des génomes, la recherche des mutations, le développement de nouveaux médicaments, etc.

État de la technique antérieure

15 Un support d'analyse de ce type comprend une pluralité de sondes oligonucléotidiques susceptibles de donner lieu à une hybridation avec les cibles biologiques à analyser. L'hybridation correspond à l'appariement des brins-cibles avec les brins d'ADN
20 complémentaires disposés sur le support. Pour déterminer la nature des cibles, il est donc nécessaire de pouvoir situer quels sont les sites du support et donc les oligonucléotides qui ont donné lieu à une hybridation.

Le document Médecine/Sciences, vol. 13, n°11, 1997, pp. 1317-1324 [1] décrit des supports d'analyse de ce type.

Habituellement on détermine l'hybridation
5 des cibles biologiques sur le support à l'aide d'un marqueur fluorescent qui est associé aux cibles biologiques, après extraction des zones intéressantes (lyse et amplification éventuelle).

Après mise en contact des cibles marquées
10 avec le support d'analyse comportant les oligosondes, on détermine les sites où a eu lieu l'hybridation en réalisant une excitation de l'ensemble des marqueurs fluorescents, suivie d'une lecture des sites pour détecter la lumière de fluorescence réémise par les
15 marqueurs. Les sites pour lesquels une lumière de fluorescence est détectée sont ceux qui ont fixé des molécules-cibles. Des systèmes de lecture adaptés à diverses biopuces sont décrits par exemple dans US-A-5 578 832 [2] et US-A-5 646 411 [3].

20 Cette technique présente l'inconvénient de nécessiter le marquage de la cible biologique avant sa mise en contact avec le support d'analyse, ce qui pose certains problèmes pratiques en ce qui concerne la quantification et/ou le rendement du marquage et le
25 délai pour l'effectuer. De plus, le marquage à une étape donnée fige la situation et empêche de réaliser par la suite des mesures dynamiques capables de suivre une réaction d'hybridation.

On peut aussi noter que la fabrication des
30 supports d'analyse ou « biopuces » est réalisée par

différentes méthodes qui toutes posent le problème du contrôle final de la qualité des supports obtenus.

En effet, la quantité de sondes déposées sur le support, les sites du support ou plots, ou dans
5 des cavités prévues dans ce support, pose le problème du contrôle effectif de la présence des oligosondes. Aucune méthode n'existe à ce jour pour quantifier et localiser avec précision les oligosondes déposées ou
10 construites in situ sur un support d'analyse réalisé par exemple en silicium, en verre ou en matière plastique, par exemple en nylon.

Exposé de l'invention

La présente invention a précisément pour objet un support d'analyse, ou biopuce, qui permet
15 d'assurer dans de meilleures conditions le contrôle préalable de fabrication, et de faciliter ensuite et rendre plus sensible la détermination des sites du support sur lesquels s'est produit une hybridation.

Selon l'invention, le support d'analyse
20 comporte une pluralité d'oligonucléotides fixés sur ce support, et il se caractérise en ce que chacun desdits oligonucléotides est marqué par un composé fluorescent qui présente une variation de fluorescence lors de l'hybridation de chaque oligonucléotide marqué avec un
25 oligonucléotide complémentaire.

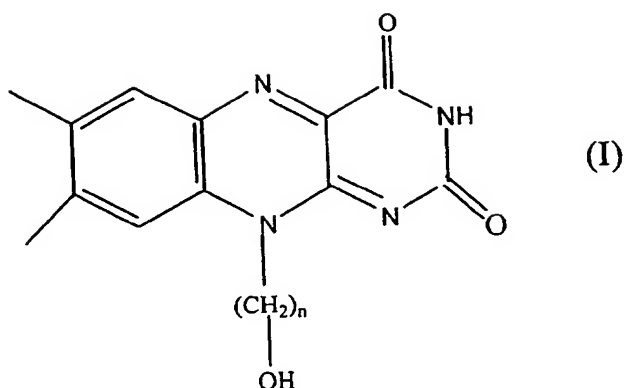
La variation de fluorescence du composé peut consister en une variation de l'intensité de fluorescence, une variation de la constante de temps de la fluorescence, ou un décalage spectral en longueur
30 d'onde de la fluorescence.

Avec un tel support d'analyse, il n'est plus nécessaire de marquer les cibles à analyser, car la localisation des sites d'hybridation peut être détectée en vérifiant la variation de fluorescence
5 obtenue lors de l'hybridation sur les sites d'oligonucléotides concernés.

Selon l'invention, on utilise de préférence un composé fluorescent présentant une intensité de fluorescence atténuée par l'hybridation. De préférence,
10 cette atténuation représente 30 à 99 % de l'intensité de fluorescence avant l'hybridation.

Des composés fluorescents présentant ces caractéristiques peuvent être constitués par exemple par la flavine, la déazaflavine et leurs dérivés. De
15 tels composés peuvent être fixés sur des oligonucléotides par l'intermédiaire d'un bras espaceur, par exemple de type $-(CH_2)_n-$, pour donner des conjugués flavine (déazaflavine)-oligonucléotide. Une synthèse de conjugués de ce type est décrite
20 par C. Frier et al dans J. Org. Chem., 62, 1997, pages 3520-3528 [4].

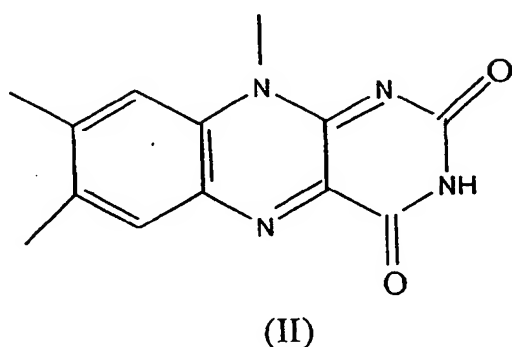
Cette synthèse consiste à fixer un dérivé de flavine sur l'oligonucléotide par une méthode de couplage phosphoramidite ou H-phosphonate en partant
25 d'un dérivé de formule :



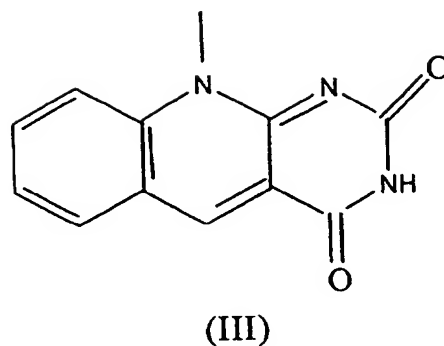
avec n étant un nombre entier de 2 à 8, par exemple 6.

La stratégie de synthèse permet d'introduire le groupe flavinique, y compris dans des procédés de synthèse oligonucléotidiques automatisés. On peut aussi utiliser cette synthèse pour la fabrication de conjugués oligonucléotides-déazaflavines.

Ainsi, l'oligonucléotide est marqué par un groupe de formule $-(CH_2)_n-R^1$ dans laquelle n est un nombre entier allant de 2 à 8, et R^1 représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :



et



L'utilisation de la flavine, de la déazaflavine ou de leurs dérivés comme composé fluorescent dans l'invention est particulièrement
5 intéressante.

En effet, les flavines sont des molécules douées d'une intense fluorescence jaune-vert, très caractéristique. Le spectre d'excitation de fluorescence est identique au spectre d'absorption de
10 lumière visible, avec 2 maxima à 374 et 446 nanomètres, et leur spectre d'émission de fluorescence consiste en une bande large avec un maximum vers 520 nanomètres. Les déazaflavines absorbent vers 320 et 396 nanomètres et présentent des intensités de fluorescence (émission
15 à 452 nanomètres) plus importantes que les flavines.

Selon l'invention, on a découvert que l'accrochage de la flavine à un oligonucléotide ne modifiait pas significativement ces propriétés de fluorescence en milieu aqueux, les maxima d'excitation
20 et d'émission ainsi que les intensités étant les mêmes pour la flavine libre et pour le conjugué oligonucléotide-flavine.

D'autre part, jusqu'à une concentration de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ en conjugué, il y a une excellente linéarité entre l'intensité de fluorescence et la concentration.

5 Il faut toutefois noter un effet de sel sur l'intensité de fluorescence, c'est-à-dire le fait que des concentrations croissantes de NaCl ont un effet croissant d'extinction « quenching » de la fluorescence des flavines. Il en est de même avec les conjugués.
10 Ceci doit être noté car l'hybridation nécessite des concentrations en NaCl de 0,1 à 1 M pour favoriser la formation de duplex (association d'un oligonucléotide avec son oligonucléotide complémentaire).

Selon l'invention, on a découvert que
15 lorsqu'un conjugué oligonucléotide-flavine est incubé avec un équivalent de sa cible oligonucléotidique complémentaire, il y a disparition de 90 à 100 % de la fluorescence spécifique de la flavine.

On a tiré profit de cet effet dans
20 l'invention pour faciliter la lecture des sites d'hybridation sur des biopuces.

Aussi l'invention a également pour objet un procédé d'analyse de cibles biologiques par mise en contact de ces cibles avec un support d'analyse
25 comportant une pluralité d'oligonucléotides, et détermination d'une (des) hybridation(s) entre les cibles et les oligonucléotides du support, caractérisé en ce que chacun des oligonucléotides du support est marqué par un composé fluorescent qui présente une
30 variation de fluorescence lors de l'hybridation de l'oligonucléotide marqué avec l'oligonucléotide

complémentaire, et en ce que l'on détermine les oligonucléotides du support ayant donné lieu à une hybridation par mesure de la fluorescence correspondant à chaque oligonucléotide du support avant et après la
5 mise en contact du support avec les cibles.

Dans ce procédé, on utilise donc le support d'analyse de l'invention présentant les caractéristiques décrites précédemment.

Selon une variante de ce procédé, on marque
10 de plus les cibles par un second composé fluorescent dont la longueur d'onde d'émission est différente de celle du composé fluorescent des oligonucléotides, ou premier composé fluorescent, et l'on contrôle les oligonucléotides ayant donné lieu à une variation de
15 fluorescence par mesure de la fluorescence de ce second composé.

Dans ce cas, le composé fluorescent des oligonucléotides du support, ou premier composé fluorescent, est choisi parmi la flavine, la
20 déazaflavine et leurs dérivés, et le second composé fluorescent est choisi parmi des fluorophores stables utilisés sur des puces à ADN et émettant préférentiellement dans le visible (Rhodamine, CY₃, CY₅ etc.), par exemple décalés vers le rouge par rapport à
25 la flavine.

Avec le support d'analyse de l'invention dont les oligonucléotides sont marqués par un composé fluorescent, on peut de plus opérer un contrôle de la qualité du support.

30 Aussi l'invention a encore pour objet un procédé de contrôle d'un support d'analyse comportant

une pluralité d'oligonucléotides fixés sur ce support, caractérisé en ce que les oligonucléotides fixés sont des oligonucléotides marqués par un composé fluorescent et en ce que l'on localise et détermine la quantité
5 d'oligonucléotides fixés sur le support par mesure de la fluorescence du composé fluorescent.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit, donnée bien entendu à titre
10 illustratif et non limitatif, en référence aux dessins annexés.

Brève description des dessins

La figure 1 est une courbe illustrant l'évolution de l'intensité de fluorescence du conjugué
15 T₁₁-déazaflavine en fonction du nombre d'équivalents de la cible poly A (SEQ ID NO : 1).

La figure 2 est une courbe illustrant l'évolution de l'intensité de fluorescence du conjugué
20 T₁₁-flavine en fonction du nombre d'équivalents de cibles poly A (SEQ ID NO : 1).

La figure 3 représente les spectres de fluorescence obtenus par hybridation du conjugué
SEQ ID NO : 12-flavine avec l'oligonucléotide complémentaire (SEQ ID NO : 13) pour des additions
25 croissantes d'équivalents de la séquence complémentaire.

La figure 4 illustre l'évolution du rapport d'intensités de fluorescence I_0/I en fonction de la

concentration $[Q]$ en composé fluorescent dans le cas d'une extinction dynamique.

La figure 5 représente l'évolution du rapport d'intensités de fluorescence I_0/I en fonction de la concentration $[Q]$ en composé fluorescent dans le cas d'une extinction statique.

La figure 6 illustre l'évolution du rapport I_0/I en fonction de la concentration $[Q]$ en composé fluorescent dans le cas d'une action combinée d'extinction statique et dynamique.

La figure 7 est une courbe illustrant l'évolution I_0/I en fonction de la concentration $[Q]$ en flavine dans le cas des spectres représentés sur la figure 3.

La figure 8 est une courbe représentant l'évolution de la constante apparente K_{app} en fonction de la concentration $[Q]$ en flavine dans le cas des spectres de la figure 3.

Exposé détaillé des modes de réalisation

Dans les exemples qui suivent, on utilise les oligonucléotides suivants :

Cible T₁₁ (SEQ ID NO : 1) :

5' ctcacgtgt aaaaaaaaaa aggcaagtact ggaagggcta attct 3'

Cible T₁₆ (SEQ ID NO : 2) :

5' ctcacgtga attctaaaaa aaaaaaaaaa agctagcggc agtac 3'

Oligonucléotide complémentaire de SEQ ID NO : 1.

(SEQ ID NO : 3) :

3' gagtagcaca tttttttt tccgtcatga ccttcccgat taaga 5'

5

Oligonucléotide complémentaire de SEQ ID NO : 2.

(SEQ ID NO : 4) .

3' gagtagcact taagattttt tttttttt tcgatcgccg tcatg 5'

10

Oligonucléotide HIV (SEQ ID NO : 5) :

5' -ttttc^{mc}ttttg gggggt-3'

15

Double brin de cible HIV (SEQ ID NO : 6 et 7) .

5' cagtcaccccc tttctttta aaaagtggct aagatctac 3' (SEQ ID NO : 6)

3' gtcagggggg aaaagaaaat tttcaccga ttctagatg 5' (SEQ ID NO : 7)

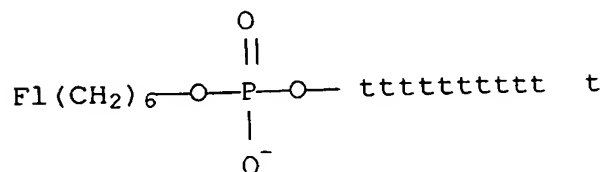
20

Exemple 1 :

Dans cet exemple, on prépare les conjugués flavine-oligonucléotide T₁₁ et flavine-oligonuclétide

25 T₁₆ en suivant le mode opératoire décrit dans le document [4] en utilisant le dérivé de flavine Fl de formule (I) avec n = 6. On obtient ainsi le conjugué (SEQ ID NO : 8) de formule :

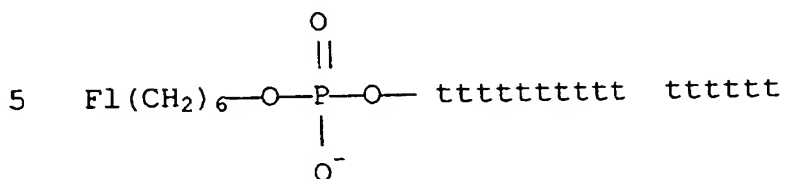
30



35

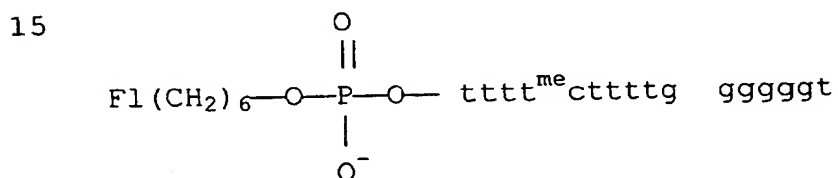
12

On prépare de la même façon un conjugué flavine-T₁₆ (SEQ ID NO : 9) de formule :

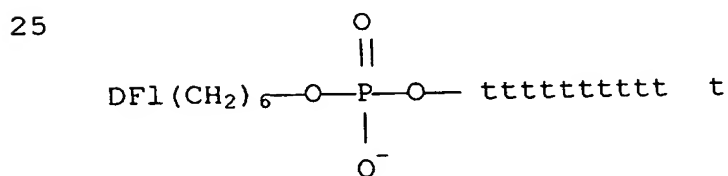


On prépare enfin le conjugué HIV-flavine en utilisant le dérivé de flavine de formule (I) avec n = 6.

(SEQ ID NO : 10) de formule :



On prépare de la même façon le conjugué T₁₁-déazaflavine DFl (SEQ ID NO : 11) de formule :



Exemple 2 :

Dans cet exemple, on étudie l'influence de la présence d'un autre oligonucléotide sur l'émission de fluorescence du conjugué T₁₁-flavine (SEQ ID NO : 8).

Dans ce but, on met en présence 0,1 à 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ du conjugué T₁₁-flavine avec 1 équivalent de l'oligonucléotide (SEQ ID NO : 1), dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,0 avec 0,1 mM-1MNaCl.

5 On réalise l'excitation à 460 nanomètres et on mesure l'émission de fluorescence autour de 540 nanomètres.

Dans ces conditions, l'émission de fluorescence ne représente plus que 5 % de l'émission
10 mesurée sur le conjugué T₁₁-flavine seul.

On recommence cette opération en présence de l'oligonucléotide (SEQ ID NO : 3), c'est-à-dire l'oligonucléotide complémentaire de SEQ ID NO : 1. Dans ces conditions, l'émission de fluorescence représente
15 98 % de l'émission de fluorescence du conjugué T₁₁-flavine. La présence de cet oligonucléotide n'a donc pas eu d'influence sur l'émission de fluorescence du conjugué T₁₁-flavine.

Si l'on recommence cette opération en
20 ajoutant 1 équivalent de l'oligonucléotide SEQ ID NO : 1 et 1 équivalent de l'oligonucléotide SEQ ID NO : 3, dans les conditions où le duplex ne peut pas se former, l'émission de fluorescence représente 6 % de l'émission de fluorescence du
25 conjugué seul.

Ainsi, il est clair que la présence de la cible complémentaire (SEQ ID NO : 1), de l'oligonucléotide T₁₁ conduit à une disparition de 90 à 100 % de la fluorescence spécifique de la flavine.

Exemple 3 :

On effectue les mêmes expériences sur le conjugué T₁₆-flavine (SEQ ID NO : 9), soit en présence de la cible T₁₆ (SEQ ID NO : 2), soit en présence de l'oligonucléotide (SEQ ID NO : 4), complémentaire de (SEQ ID NO : 2), soit en présence du mélange des deux oligonucléotides SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4, dans les conditions où le duplex ne peut pas se former.

On obtient les résultats suivants :

10

Oligonucléotides	Emission à 540 nm
T ₁₆ -flavine (SEQ ID NO : 9), avec sa cible (SEQ ID NO : 2),	100 % 2 %
avec l'oligonucléotide (SEQ ID NO : 4), complémentaire de la cible,	91 %
avec SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 4, (conditions où le duplex ne se forme pas)	4%

Ainsi, comme dans le cas de l'exemple 2, la présence de la cible (SEQ ID NO : 2) de l'oligonucléotide T₁₆ conduit à une extinction de fluorescence de la flavine en raison de l'hybridation entre la cible et l'oligonucléotide T₁₆.

Exemple 4 :

Dans cet exemple, on teste les propriétés de l'oligonucléotides HIV conjugué à la flavine (SEQ ID NO : 10), en présence du duplex HIV formé par les SEQ ID NO : 6 et SEQ ID NO : 7.

Dans ces conditions, l'émission de fluorescence représente 90 % de l'émission initiale. Il n'y a pas eu d'hybridation entre le conjugué Fl-HIV et

le duplex puisque la cible de HIV avait déjà donné lieu à une hybridation.

Les exemples 2 à 4 montrent ainsi que l'extinction de fluorescence est spécifique de la formation d'un duplex entre le conjugué oligonucléotide-flavine et l'oligonucléotide complémentaire pour les raisons suivantes :

- 1) Une élévation de température, qui conduit à une déstabilisation du duplex et à un déplacement de l'équilibre : double-brin → simples brins fait remonter l'intensité de fluorescence. Il est à noter que la spectroscopie de fluorescence constitue donc une bonne méthode pour évaluer les constantes d'association à une température donnée. Une nouvelle baisse de température diminue à nouveau l'intensité de fluorescence.
- 2) L'addition d'un oligonucléotide non complémentaire du conjugué ne conduit pas à une diminution de la fluorescence.
- 3) L'addition d'un double brin, complémentaire du conjugué à une solution de conjugué oligonucléotide-flavine dans des conditions qui conduisent à la formation de triplex ne conduit pas à une extinction de fluorescence, comme il apparaît dans l'exemple 4.
- 4) Lorsque la cible est un ARN complémentaire, on observe également une diminution de la fluorescence mais à un degré moindre.

On peut encore noter que le doublet gg adjacent à la séquence A₁₁ de l'oligonucléotide SEQ ID NO : 1, qui ne participe pas à l'appariement, n'est pas nécessaire puisque des résultats identiques
5 ont été obtenus avec des oligonucléotides identiques à SEQ ID NO : 1, mais comportant à la place de gg, les séquences gc, cg et cc.

Exemple 5 :

10 Dans cet exemple, on étudie l'influence de la présence de l'oligonucléotide cible SEQ ID NO : 1 à des concentrations allant jusqu'à 1,5 équivalent pour 1 équivalent du conjugué T₁₁-déazaflavine (SEQ ID NO : 11) sur la fluorescence de la déazaflavine
15 du conjugué. On opère dans les mêmes conditions que celles des exemples 2, 3 et 4.

La figure 1 illustre les résultats obtenus, soit l'évolution de l'intensité de fluorescence à 452 nanomètres en fonction du nombre d'équivalents de
20 la cible poly A (SEQ ID NO : 1).

Exemple 6 :

Dans cet exemple, on effectue la même expérience que dans l'exemple 5, mais en utilisant
25 comme conjugué le conjugué T₁₁-flavine (SEQ ID NO : 8).

La figure 2 illustre les résultats obtenus, soit l'intensité de fluorescence à 520 nanomètres en fonction du nombre d'équivalents de la cible poly A (SEQ ID NO : 1).

Une comparaison des figures 1 et 2 montre que les écarts de fluorescence sont plus importantes avec la déazaflavine qui est de ce fait plus sensible.

5 **Exemple 7 :**

Dans cet exemple, on étudie la stabilité du complexe T₁₁-flavine (SEQ ID NO : 8) avec la SEQ ID NO : 1 complémentaire. On effectue des expériences de gel-retard et de mesure de la température de fusion T_m. On a ainsi pu montrer que la présence d'une flavine ou d'une déazaflavine en bout d'un oligonucléotide confère un important surcroît de stabilité au complexe que fait cet oligonucléotide avec l'oligonucléotide complémentaire.

Par exemple, à une concentration en NaCl de 0,1 M, la séquence T₁₁ conduit à un complexe avec l'oligonucléotide SEQ ID NO : 1 avec un T_m de 23°C (37°C à 1 M NaCl), tandis que le conjugué T₁₁-flavine (SEQ ID NO : 8) donne avec SEQ ID NO : 1, un complexe avec un T_m de 28°C (42°C à 0,1 M NaCl).

Des expériences de gel-retard montrent que la formation du duplex nécessite des quantités beaucoup moins grandes de conjugué T₁₁-flavine (SEQ ID NO : 8) que d'oligonucléotide T₁₁ sans flavine.

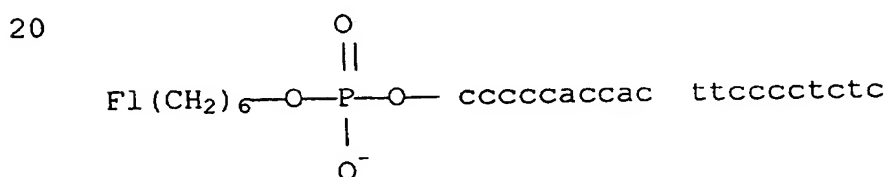
On a trouvé des résultats similaires avec le conjugué T₁₆-flavine (SEQ ID NO : 9) et la cible (SEQ ID NO : 2) par rapport à T₁₆ sans flavine.

L'étude des conjugués d'oligonucléotides-flavines (SEQ ID NO : 8 et 9) révèle une propriété tout à fait intéressante de ces molécules :

- la présence de la flavine stabilise l'association de ce conjugué avec l'oligonucléotide complémentaire, par un mécanisme encore mal compris (liaisons hydrogène entre la flavine et les bases nucléiques, stacking, ...)
- cette association conduit à une diminution très importante de la fluorescence (extinction dans certains cas),
- cette extinction de fluorescence est très spécifique : elle ne se produit que lorsque le conjugué se trouve en présence de l'oligonucléotide complémentaire, dans des conditions de formation du duplex.

15 Exemple 8 :

Dans cet exemple, on met en contact un conjugué formé d'un oligonucléotide de 20 méres et de flavine (SEQ ID NO : 12) :



avec l'oligonucléotide complémentaire (SEQ ID NO : 13) :
ctagcctgat gagaggggaa gtggtggggg agacatagcc

en concentration croissante, dans les mêmes conditions que celles des exemples 2 à 4, et on mesure le spectre de fluorescence autour de 520 nanomètres au spectrofluorimètre.

30

La longueur d'onde d'excitation est de 446 nanomètres et l'émission maximale correspondant à la flavine est à 520 nanomètres.

On effectue la mesure instantanément, puis 5 minutes après, avec à chaque fois une concentration plus importante de la cible complémentaire (SEQ ID NO : 13).

La figure 3 illustre les spectres de fluorescence obtenus sans l'oligonucléotide complémentaire, puis avec 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2 et 1,4 équivalents de l'oligonucléotide complémentaire SEQ ID NO : 13.

A partir d'une intensité initiale de 318 en l'absence de la cible (l'oligonucléotide complémentaire), on observe une extinction de fluorescence d'un rapport 20 environ lorsque que l'on met en léger excès la cible complémentaire.

L'extinction peut correspondre à divers processus qui peuvent être soit un transfert d'énergie, soit une extinction par collision (« quenching collisionnel »), soit la formation de complexe (« quenching statique ») qui correspond à l'hybridation sonde-cible.

L'extinction par collision ou (« quenching collisionnel ») intervient lorsqu'il y a collision entre le composé fluorescent (flavine) et l'oligonucléotide extincteur en concentration [Q]. Il est décrit par la loi de Stern-Volmer qui correspond à l'équation suivante :

$$I_0/I = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

où h_q représente la constante d'extinction et τ_0 est la durée de vie de fluorescence.

La constante de Stern-Volmer est définie de la façon suivante :

5
$$K_D = h_q \tau_0.$$

Dans ce cas, d'une part, la durée de vie devient τ et $I_0/I = \tau_0/\tau$, d'autre part la température a pour effet d'accroître le phénomène, K_d augmente lorsque la température augmente.

10 La figure 4 illustre l'évolution de I_0/I et de τ_0/τ , en fonction de $[Q]$. Lorsqu'on augmente la température, la pente de la droite augmente.

Dans le cas d'une extinction par formation de complexe, c'est-à-dire dans le cas qui nous
15 intéresse, l'hybridation sonde/cible, soit le « quenching statique », la loi de Stern-Volmer devient :

$$I_0/I = 1 + K_s [Q]$$

20 où K_s est la constante d'association.

La figure 5 illustre l'évolution de I_0/I en fonction de $[Q]$. Dans ce cas, $\tau_0/\tau = 1$ et la pente diminue lorsque la température augmente, ce qui est normal puisqu'un accroissement de température provoque
25 une dénaturation partielle du complexe, donc le fluorophore qui était éteint se trouve libéré.

Dans la plupart des cas, comme représenté sur la figure 6, on trouve conjointement une action combinée de « quenching » statique et dynamique, ce qui

se traduit par une courbure positive vers l'axe y. La relation de Stern-Volmer doit être ainsi modifiée :

$$I_0/I = 1 + (K_d + K_s) [Q] + K_d K_s [Q]^2$$

5

Si l'on revient aux spectres de fluorescence illustrés sur la figure 3, et que l'on trace la loi I_0/I en fonction de $[Q]$ à partir des spectres, on trouve de fait une courbure positive et non une droite, ce qui traduit la présence simultanée de « quenching » statique et dynamique, comme il apparaît sur la figure 7.

La figure 8 illustre la variation de K_{app} en fonction de la concentration $[Q]$ en équivalents à partir des résultats de la figure 3.

On accroche à la cible un deuxième fluorophore, non sujet au « quenching » et fortement décalé en longueur d'onde de fluorescence par rapport au composé fluorescent. Ainsi, ce fluorophore pourra être excité parallèlement et révélera la présence effective du complexe d'hybridation.

On peut utiliser en particulier un fluorochrome tel que CY_3 qui a une longueur d'onde d'excitation égale à 543,5 nanomètres et une longueur d'onde d'émission égale à 580 nanomètres. Il peut être révélé avec un scanner utilisant un laser HeNe vert de faible puissance (1 mW) tel qu'il est fait dans un système de lecture de biopuces.

Ce double marquage, c'est-à-dire celui de l'oligonucléotide fixé sur la biopuce au moyen d'un premier composé fluorescent tel que la flavine, et

celui des cibles à déterminer par un second composé fluorescent tels que CY₃, possède des avantages indéniables par rapport à un simple marquage traditionnel.

5 En effet, lors de l'immobilisation des sondes sur la biopuce, la présence de flavine permet un contrôle de la qualité des sondes avant hybridation, en faisant une image totale de la puce de sorte que tous les sites possédant des sondes fluorescent. Il y a
10 alors possibilité de cartographier les défauts de la puce, (image non homogène en intensité de fluorescence) ; il y a aussi possibilité de profiter de la redondance en mettant le même type de sonde sur plusieurs sites contigus.

15 Lors de la phase d'hybridation, on observe une diminution de fluorescence sur les sites concernés avec une lecture à 520 nanomètres en excitant autour de 400-450 nanomètres. Une lecture de CY₃ permet alors de résoudre la non-spécificité puisque seuls les complexes
20 hybridés posséderont la cible CY₃ conjointement à la décroissance de fluorescence.

 L'intérêt de plages de longueurs d'onde très distinctes réside dans le fait que l'excitation à 400-450 nanomètres ne fait quasiment pas fluorescer CY₃
25 car on est très loin de sa bande d'absorption (absorption maximale à 550 nanomètres).

 Un paramètre intéressant qui peut être évalué est la durée de vie qui, on l'a vu, ne varie pas lors de la formation de complexes mais varie fortement
30 dans le cas de « quenching » dynamique. On peut donc facilement séparer les deux phénomènes en compétition :

le « quenching » collisionnel et la formation d'hybrides qui seule est intéressante.

Un autre paramètre qu'il convient de suivre est l'évolution de la fluorescence en fonction de la température. En effet, dans une "puce" traditionnelle, on lit la fluorescence à une température donnée. L'élévation de température a pour effet de "casser" les hybridations non-spécifiques (dénaturation) mais aussi pour effet fâcheux de réduire la fluorescence du complexe (puisque le rendement quantique de fluorescence diminue lorsque la température augmente). Dans le cas de « quenching » statique, on a vu que l'élévation de température restaure au contraire la fluorescence des complexes mal hybridés puisqu'il y a "libération" du fluorophore incriminé.

Ainsi, l'association judicieuse d'une lecture à 2 marqueurs (flavine + fluorophore traditionnel), contrôle en température, voire mesure de durée de vie, permet de suivre parfaitement la formation des hybrides et même de calculer les différentes constantes (constante de Stern-Volmer, constante d'association, voire même calcul des rayons des sphères d'action).

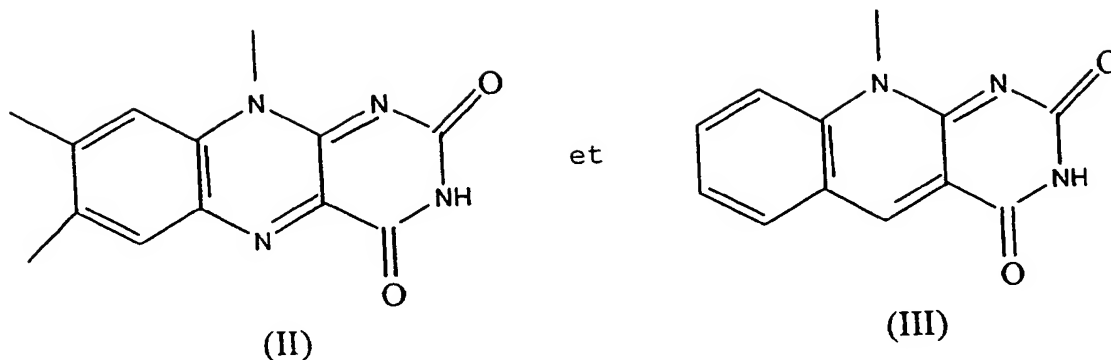
25

Références citées

- [1] : Médecine/Sciences, vol. 13, n°11, 1997, pp. 1317-1324
- [2] : US-A-5 578 832
- 30 [3] : US-A-5 646 411
- [4] : C. Frier et al, J. Org. Chem., 62, 1997, pages 3520-3528.

REVENDICATIONS

1. Support d'analyse comportant une pluralité d'oligonucléotides fixés sur ce support, caractérisé en ce que chacun desdits oligonucléotides est marqué par un composé fluorescent qui présente une variation de fluorescence lors de l'hybridation de chaque oligonucléotide marqué avec un oligonucléotide complémentaire.
2. Support selon la revendication 1, dans lequel la variation de fluorescence consiste en une variation de l'intensité de fluorescence, une variation de la constante de temps de la fluorescence, ou un décalage en longueur d'onde de la fluorescence.
3. Support d'analyse selon la revendication 2, dans lequel le composé fluorescent présente une intensité de fluorescence atténuée par l'hybridation.
4. Support selon la revendication 3, dans lequel l'atténuation représente 30 à 99 % de l'intensité de fluorescence avant l'hybridation.
5. Support selon la revendication 3 ou 4, dans lequel le composé fluorescent est choisi parmi la flavine, la déazaflavine et leurs dérivés.
6. Support selon la revendication 5, dans lequel l'oligonucléotide est marqué par un groupe de formule $-(CH_2)_n-R^1$ dans laquelle n est nombre entier allant de 2 à 8 et R^1 représente un groupe répondant à l'une des formules suivantes :



7. Support selon la revendication 6, dans lequel n est 6.

8. Procédé de contrôle d'un support d'analyse comportant une pluralité d'oligonucléotides fixés sur ce support, caractérisé en ce que les oligonucléotides fixés sont des oligonucléotides marqués par un composé fluorescent et en ce que l'on localise et détermine la quantité d'oligonucléotides fixés sur le support par mesure de la fluorescence du composé fluorescent.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel le composé fluorescent est choisi parmi la flavine, la déazaflavine et leurs dérivés.

10. Procédé d'analyse de cibles biologiques par mise en contact de ces cibles avec un support d'analyse comportant une pluralité d'oligonucléotides et détermination d'une (des) hybridation(s) entre cibles et oligonucléotides du support, caractérisé en ce que l'on utilise un support d'analyse selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, et en ce que l'on détermine les oligonucléotides du support qui ont donné

lieu à une hybridation par mesure de la fluorescence correspondant à chaque oligonucléotide du support avant et après mise en contact du support avec les cibles.

11. Procédé selon la revendication 10, dans
5 lequel on marque de plus les cibles par un second composé fluorescent dont la longueur d'onde d'émission est différente de celle du composé fluorescent des oligonucléotides, ou premier composé fluorescent, et l'on contrôle les oligonucléotides ayant donné lieu à
10 une variation de fluorescence par mesure de la fluorescence de ce second composé.

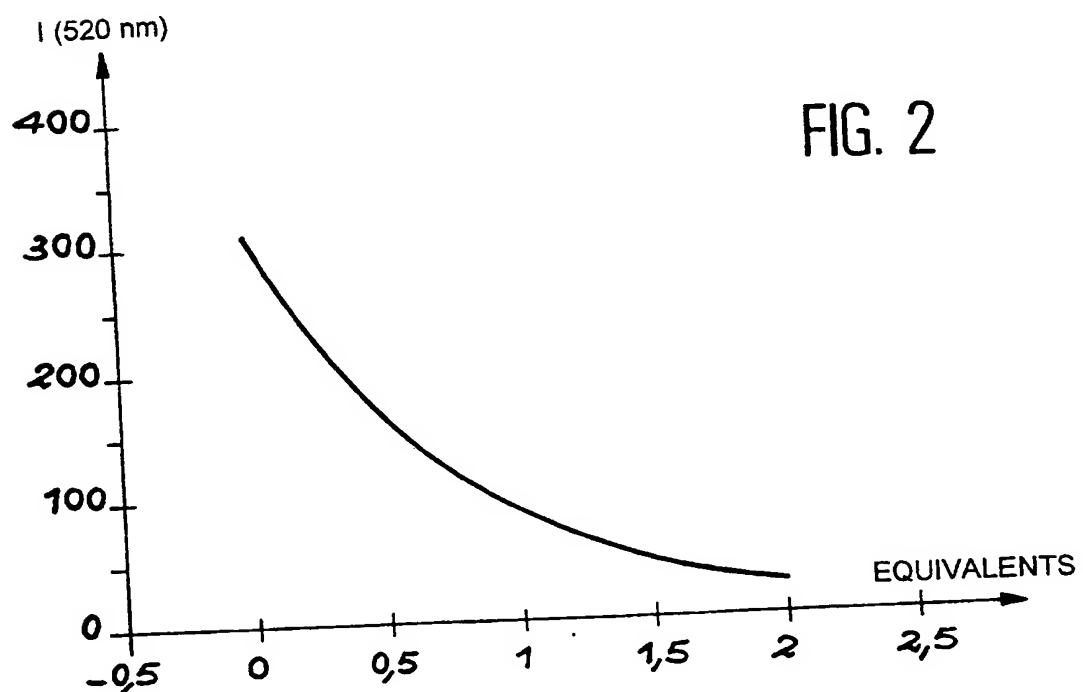
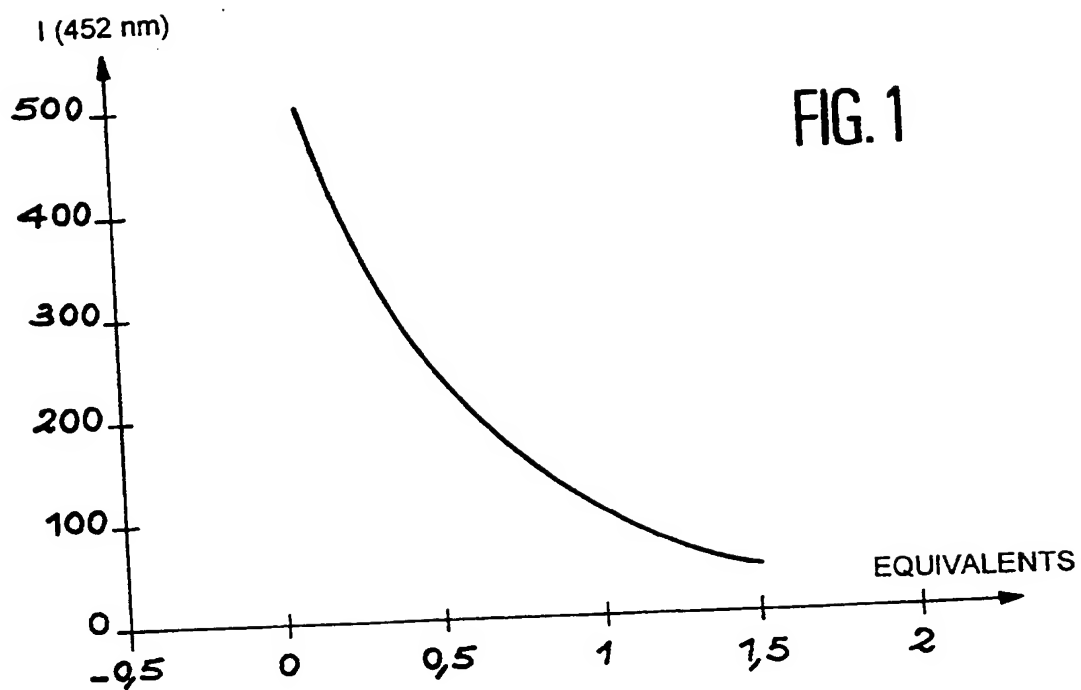
12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, dans lequel le composé fluorescent des oligonucléotides du support, ou premier composé
15 fluorescent, est choisi parmi la flavine, la déazaflavine et leurs dérivés, et le second composé fluorescent est choisi parmi les fluorophores stables décalés vers le rouge par rapport à la flavine.

13. Procédé selon l'une quelconque des
20 revendications 10 à 12, dans lequel on mesure l'intensité de fluorescence du premier composé par spectrométrie.

14. Procédé selon la revendication 11, dans lequel le second composé fluorescent est le CY₃ dont la
25 longueur d'onde d'excitation est de 543,5 nanomètres et la longueur d'onde d'émission est de 580 nanomètres.

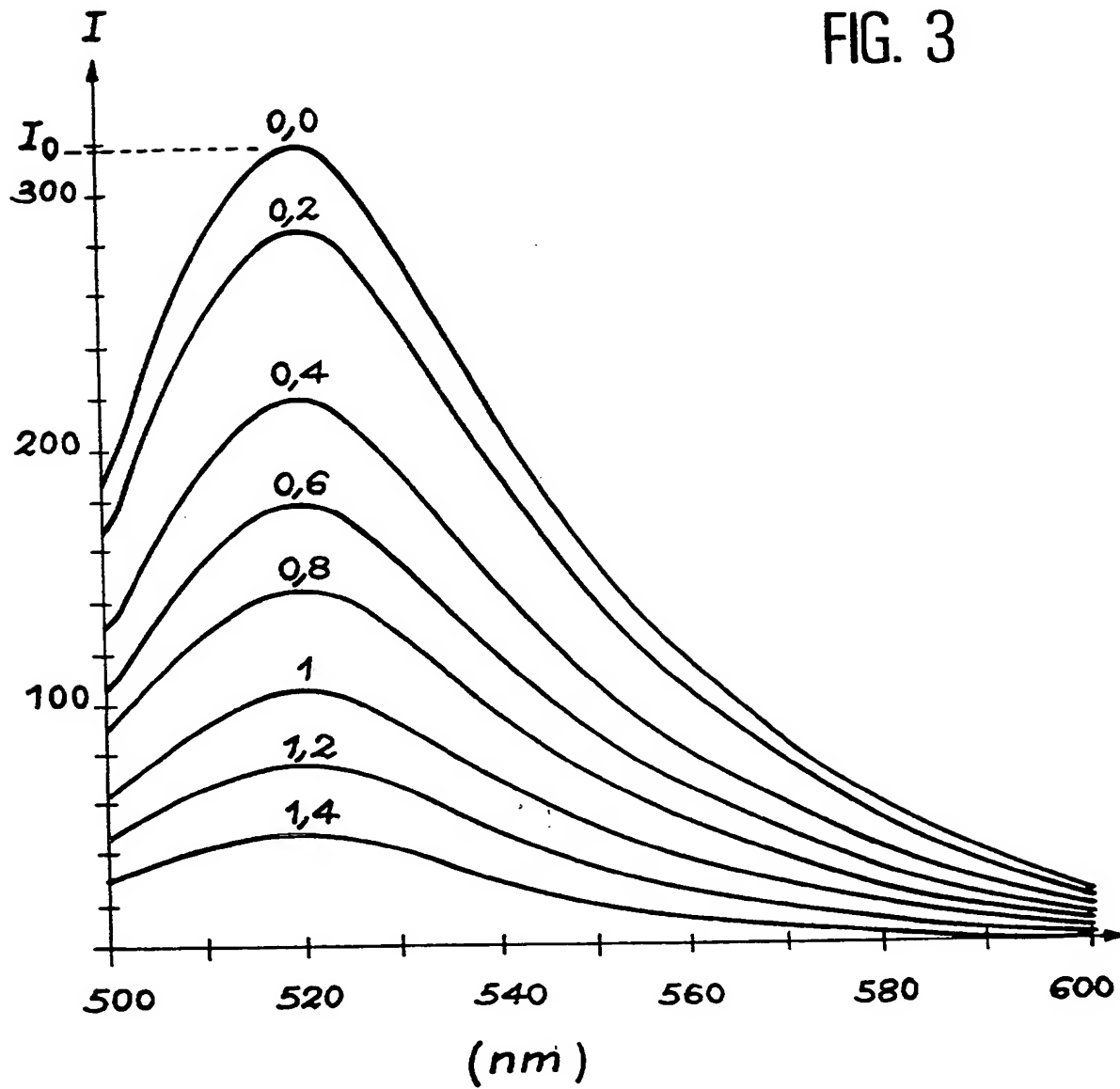
15. Procédé selon la revendication 14, dans lequel on détermine la présence de ce second composé avec un scanner utilisant un laser HeNe.

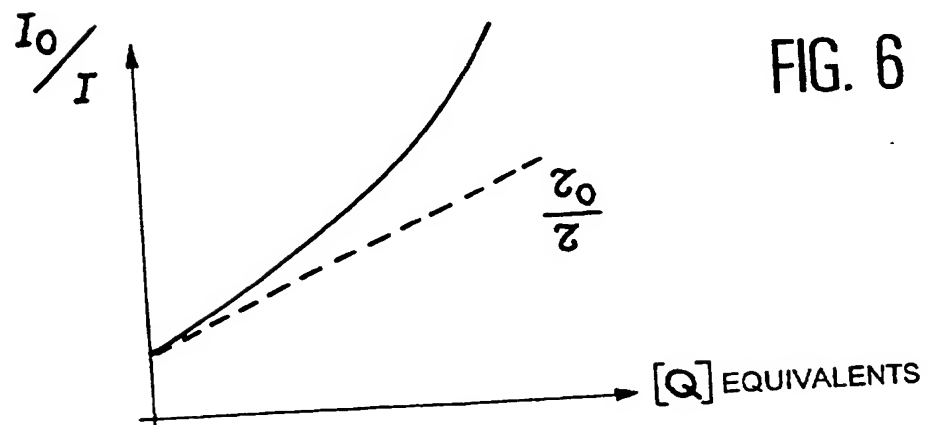
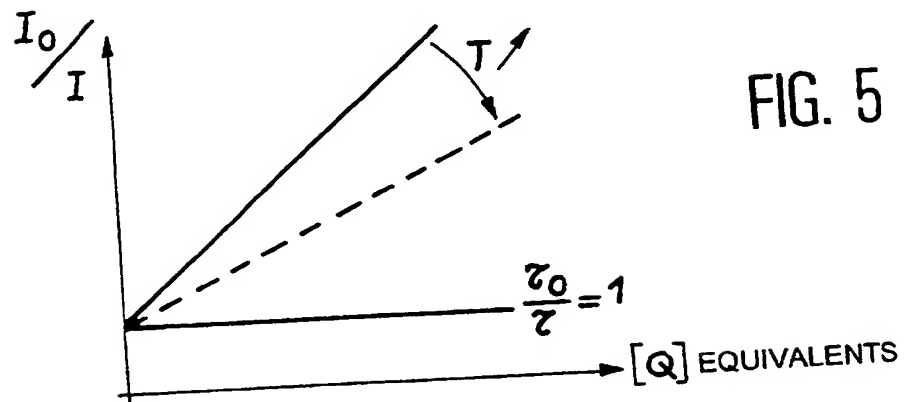
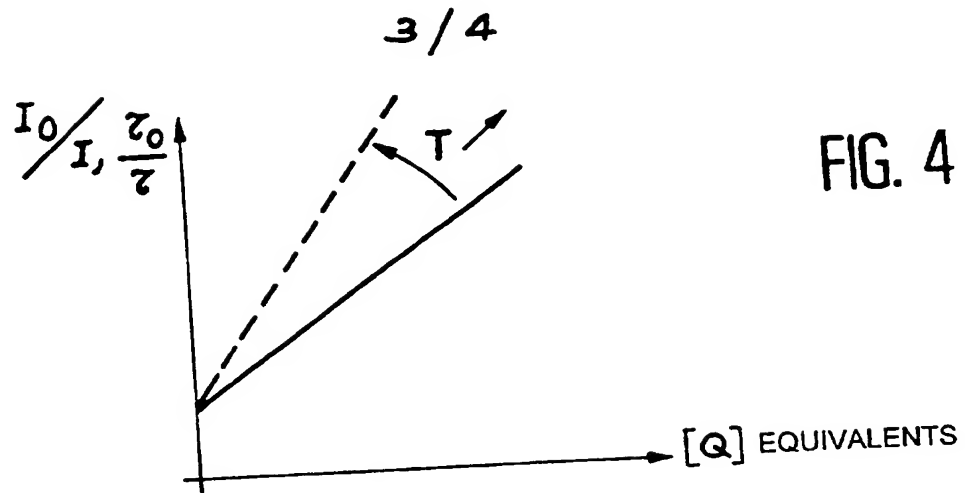
1/4



2/4

FIG. 3





4/4

FIG. 7

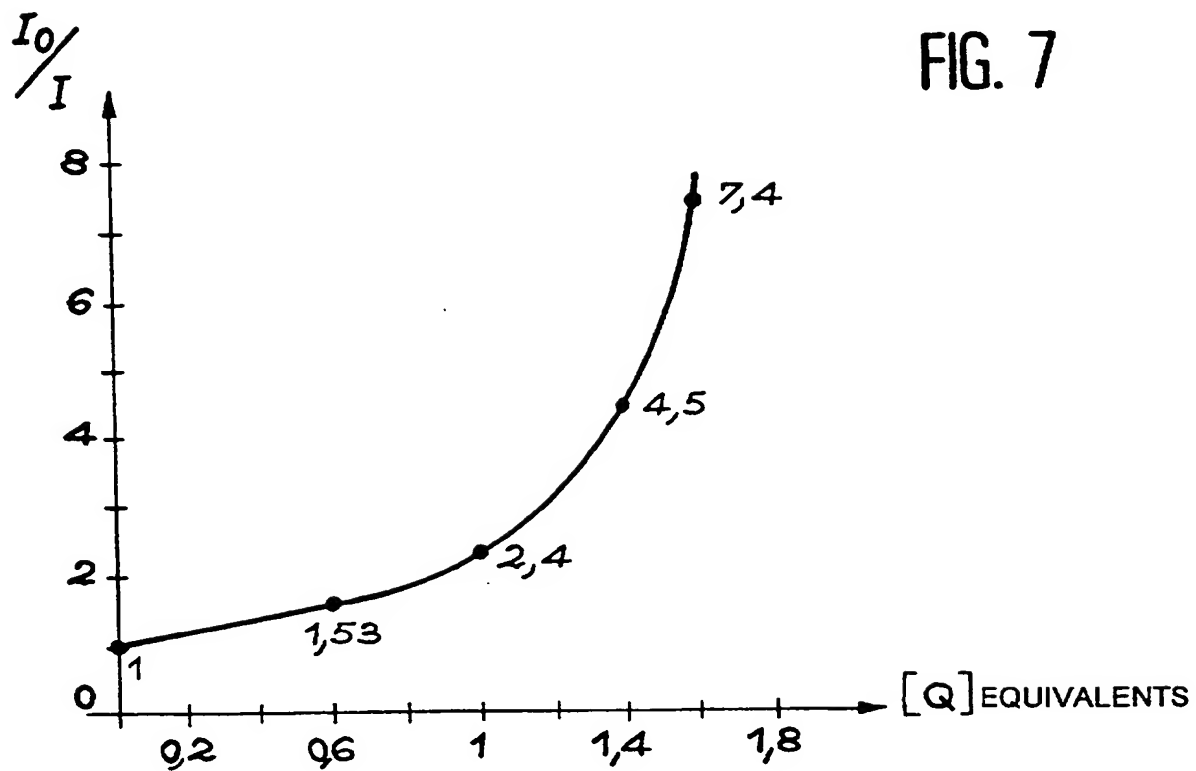
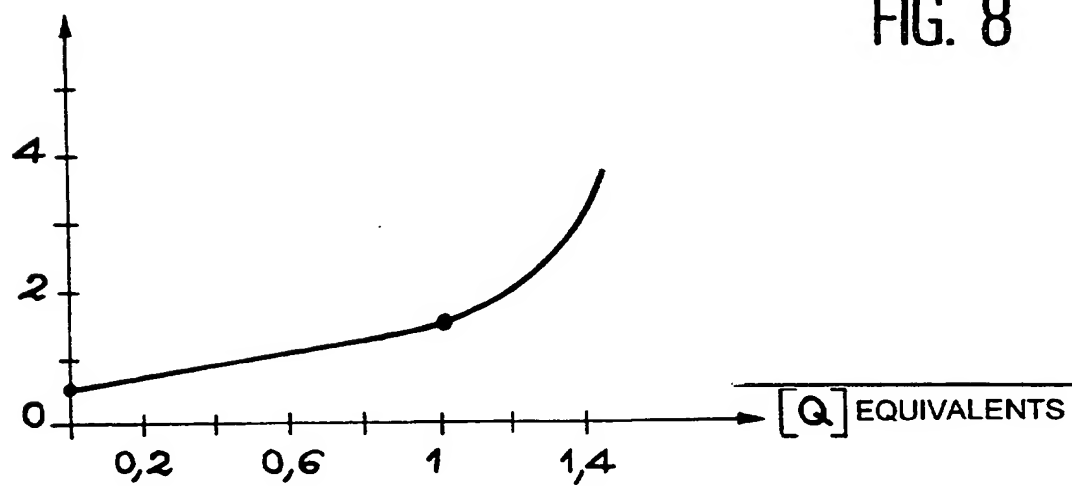
 K_{app}

FIG. 8





RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2805348

N° d'enregistrement
national

FA 584291
FR 0002236

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 99 13105 A (SVANVIK NICKE ; KUBISTA MIKAEL (SE); WESTMAN GUNNAR (SE)) 18 mars 1999 (1999-03-18)	1-4, 8, 10, 11, 13	G01N33/543 G01N33/533 G01N33/68
Y	* page 1; revendication 14; figure 1 * * page 4; revendication 18; figure 3 *	5-7, 9, 12	B01L3/00 C12Q1/68
Y	US 5 925 525 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 20 juillet 1999 (1999-07-20) * colonne 52, ligne 29-43 *	5-7, 9, 12	
X	US 5 876 930 A (FLOOD SUSAN J A ET AL) 2 mars 1999 (1999-03-02) * colonne 4; figure 2 * * colonne 9; revendications *	1, 2, 10, 13	
X	US 5 861 247 A (MIRZABEKOV ANDREI DARIEVICH ET AL) 19 janvier 1999 (1999-01-19) * colonne 8; revendications 4, 5; figure 4 *	1, 2, 10, 13	
X	WO 99 60158 A (LAB OF MOLECULAR BIOPHOTONICS ; ABE SATOSHI (JP); TOYONAGA SHUJI (J) 25 novembre 1999 (1999-11-25) * abrégé; figure 2 *	1, 2, 10, 13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12Q
X	WO 99 05320 A (TABONE JOHN C ; RAPIGENE INC (US); MOYNIHAN KRISTEN (US); NESS JEFF) 4 février 1999 (1999-02-04) * page 18, ligne 1-15; exemples 4, 5 *	8	
X	US 5 843 655 A (MCGALL GLENN) 1 décembre 1998 (1998-12-01) * colonne 7-9; figure 11 *	8	
	-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
21 novembre 2000		Reuter, U	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>			
<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 584291
FR 0002236

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A,D	FRIER C. ET AL: "Method for preparing new flavin derivatives: Synthesis of flavin-thymine nucleotides and flavin-oligonucleotide adducts." JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, (1997) 62/11 (3520-3528). , XP002153482 * le document en entier * -----	1-15	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		21 novembre 2000	Reuter, U
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

THIS PAGE BLANK (USPTO)